

ステロイド投与家兎骨壊死モデルにおける骨内の血管内皮増殖因子の発現について

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学
(旧講座名：整形外科学)
(主任：富田勝郎教授)

柳 下 信 一

特発性大腿骨頭壊死症の病因として副腎皮質ホルモン剤 (以下ステロイド剤) 投与歴はよく知られているが、いまだその詳細な病態は明らかではない。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) は、血管内皮細胞に特異的に作用し、その増殖を促す蛋白である。組織の低酸素状態に反応して誘導されるという特徴から、動物モデルの虚血性病変において発現が亢進するといった報告が数多くされている。このような特徴から、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の病態において、VEGFの発現を検討することにより、虚血との関連をより明らかにすることができると考えられる。4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを1回のみ投与したステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いて、ステロイド投与後の骨内VEGFの発現を調べ、ステロイド性骨壊死発生との関連およびその虚血発作の発現時期について検討した。病理組織学的検討では、骨壊死はステロイド投与後5日より認めた。またほとんどの骨壊死は骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に集中していた。したがって4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを1回のみ投与した家兎はステロイド性骨壊死動物モデルとして有用であることが確認された。免疫組織化学的検討で、VEGF発現細胞はステロイド投与後1週以内の比較的早期に、局所に集簇してみられる場合が多く、間質系細胞のみならず、骨髓血球系の細胞を含めた多種の細胞に発現していた。またVEGF陽性率はステロイド投与後1週以内で高く、VEGF陽性部位は骨壊死の好発部位である骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に多かった。VEGF-mRNAの発現は、ステロイド投与後3日目にピークを認め、それと同時にVEGF蛋白も3日目に発現した。またVEGF-mRNA発現のピークはある特定の一時期だけであった。これらの結果から、本モデルの大腿骨においては、ステロイド投与後に局所の虚血、低酸素状態が発生し、それに対して組織がVEGFを発現したと考えた。またステロイド投与後早いものでは2日目に、遅くとも3日前後には虚血発作が発生し、その虚血発作は繰り返すことのないものであると考えた。

Key words osteonecrosis, rabbit, steroid, vascular endothelial growth factor

特発性大腿骨頭壊死症は壮年期成人に好発し、その罹患によって股関節が破壊され起立歩行障害により生活の質 (quality of life, QOL) が著しく侵される疾患である。本疾患の病因は現在のところ明らかではないが、背景因子として副腎皮質ホルモン剤 (以下ステロイド剤) 投与歴やアルコール愛飲歴などが知られている¹⁾。特にステロイド剤使用後の本疾患発症患者は近年増加しており、全大腿骨頭壊死症患者の半数以上を占めている現状は問題である¹⁾。ステロイド剤はその確実な薬効ゆえに全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE)、関節リウマチなどの膠原病やアレルギー疾患をはじめ、多くの疾患に広く使われている。一方、その副作用も多く、大腿骨頭壊死症をはじめとするステロイド誘発性骨壊死 (steroid-induced osteonecrosis) も重大な副作用とみなされている。

ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生機序については、最終的に骨内の虚血によって発生するという点では意見の一致をみている^{2) 3)}ものの、虚血の発生した時期や虚血に至る詳細な機序などは未だ解明されていない。その原因として、骨壊死が生じて無症候性の症例がしばしば存在すること⁴⁾、股関節痛

などの症状発症時には壊死発生時よりかなり時間が経過しており、すでに壊死が完成してしまっているため、骨壊死発生直後の早期の病理像をとらえることが困難であること、再現性の良好な動物モデルが存在しなかったことが挙げられる⁵⁾。

動物モデルについては、近年Yamamotoら⁶⁾、加畑⁵⁾がメチルプレドニゾロンを家兎に投与したステロイド投与家兎を作成し、検討した結果、その大腿骨、上腕骨、下腿骨の骨幹端から骨幹部にかけて病理組織学的にヒトの骨壊死と類似した骨壊死が生じることを明らかにした。現在ではこの動物モデルが、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の病因、病態を解明するための再現性の良い有用なモデルとして認識されている。

したがって、このステロイド投与家兎に認められる骨壊死が、ヒトのステロイド誘発性大腿骨頭壊死症と同様に虚血によって発生するのか、さらにはその虚血がいつ発生するのかについて検討することは骨壊死発生のメカニズムを解明し、骨壊死の予防法を確立することにつながると考える。

一方、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) は、血管内皮細胞に特異的に作用し、その増殖を促す

平成17年10月18日受付, 平成17年12月12日受理

Abbreviations : VEGF, vascular endothelial growth factor

蛋白である。組織の低酸素状態に反応して誘導されるという特徴から、動物モデルの虚血性病変において発現が亢進するといった報告が数多くされている^{7)~11)}。このような特徴を踏まえると、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の病態において、VEGF の発現を検討することにより、虚血との関連をより明らかにすることができると考えられる。

そこで本研究では、ステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いて、ステロイド投与後の骨内 VEGF の発現を調べ、ステロイド性骨壊死発生との関連およびその虚血発作の発現時期について検討した。

対象および方法

実験動物には体重約 3.5kg の成熟雌性日本白色家兎を用いた。また本研究のプロトコルは、金沢大学医学部動物実験倫理委員会の規約に基づいて行われたものである。

I. ステロイド投与家兎における骨壊死部の病理組織学的変化と骨壊死発生率、および発生部位についての検討 (実験 1)

体重 1kg あたり 4mg の酢酸メチルプレドニゾロン (日本アップジョン、東京) を 1 回のみ右殿筋部に筋注したステロイド投与家兎 (ステロイド群) を作成した。ステロイド投与 1 日後、3 日後、5 日後、1 週後、2 週後、4 週後に屠殺したモデルをそれぞれ 1 日群、3 日群、5 日群、1 週群、2 週群、4 週群とし、各群をそれぞれ 10 羽ずつ作成した。これらに、ステロイドを投与せず同一条件で飼育した対照用家兎 (対照群) を 10 羽作成し、ステロイド群と対照群のあわせて 7 群間で検討した。処置の終了後にネンブタール (大日本製薬、大阪) の急速静注にて家兎を安楽死させ、ただちに両側の大腿骨を摘出した。摘出の後に組織切断機 (Exakt, Hamburg, Germany) を用いて、大腿骨近位部をそれぞれの関節面より約 4cm の位置で骨軸に垂直に切断し、環状面で最大断面が得られるように切断した。切断後直ちに 10% ホルマリンに浸漬して約 48 時間固定し、EDTA 液で脱灰、パラフィン切片を作成した後、HE 染色標本を作成し、以下の項目につき検討した。

1. 病理組織学的変化

骨髄の造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴い、ある一定領域の骨細胞がびまん性に壊死したものを骨壊死と定義し⁶⁾、それぞれの群に認められた骨壊死部の病理組織学的な変化について検討した。

2. 骨壊死発生率

骨壊死の発生率は、用いた家兎数に対する骨壊死を認めた家兎数の割合で算出した。採取した両側の大腿骨のどちらか一方にでも骨壊死を認めた場合は、骨壊死ありとした。有意差の検定において、多群間の差の検定には χ^2 検定を用い、2 群間の差の検定には Fisher の直接確率計算法を用いた。危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありとした。

3. 骨壊死発生部位

骨壊死の発生部位は、大腿骨近位部を骨端部 (骨頭部、大転子部) 骨幹端部 (内側、外側)、転子下部 (内側、外側)、骨幹部 (内側、外側)、の 8 区域に分け評価した⁹⁾。

II. ステロイド投与家兎大腿骨近位部における VEGF の発現についての検討 (実験 2)

ステロイド投与家兎の骨壊死好発部位である、大腿骨近位部における VEGF 発現細胞、陽性率、陽性部位を検討した。

1. VEGF 発現細胞の観察

標識ストレプトアビジン・ビオチン法 (Labeled streptavidin biotin) による免疫組織化学法により VEGF 発現細胞を観察した。

実験 1 で作成したステロイド群 (6 群) と対照群のあわせて 7 群間で検討した。それぞれの大腿骨近位部のパラフィン切片を、まずキシレンおよびエタノールにより脱パラフィンをし、0.3% 過酸化水素加メタノールに 30 分間浸し内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害 (あるいは除去) した。PBS で洗浄後、非特異的な反応を除去するために、5% ウシ血清アルブミンに 30 分間浸した。一次抗体として、抗 VEGF マウスモノクローナル抗体 ($\times 100$, NEOMARKERS, Fremont, USA) を用い、4℃ で一晩反応させた。PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、二次抗体としてビオチン化ウサギ抗マウス IgG 二次抗体 ($\times 200$, DAKO, Glostrup, Denmark) を用い、室温で 60 分間反応させ、PBS で 5 分間、3 回洗浄した。ついで、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (peroxidase labeled streptavidin) ($\times 300$, DAKO, Glostrup, Denmark) と室温で 30 分間反応させた後、PBS で 5 分間、3 回洗浄した。さらに、0.0006% 過酸化水素加 0.05% ジアミノベンチジン (diaminobenzidine) (同仁化学研究所、熊本) 溶液にて、5~10 分間発色させた。発色は顕微鏡で観察して確認した。核染色はマイヤーヘマトキシリンにて行い、脱水、透徹、封入し光学顕微鏡下の観察に用いた。陽性対照として、ヒト脾組織のランゲルハンス島 B 細胞を用いた。また、陰性対照としては 1 次抗体の代わりに PBS を用いた。

2. VEGF 陽性、陽性率、陽性部位の判定方法

上記の方法により、細胞質が濃染された細胞を VEGF 発現細胞と判定した。また強拡大の同一視野において、10 個以上の VEGF 発現細胞の集簇を認めた場合に「VEGF 陽性」の個体と判定した。

VEGF 陽性率は、用いた家兎数に対する VEGF 陽性の家兎数の割合で算出した。採取した両側の大腿骨のどちらか一方でも VEGF 陽性であった場合は、VEGF 陽性とした。

VEGF 陽性部位は、実験 1 と同様に大腿骨近位部を 8 区域に分け評価した。

III. VEGF- mRNA、VEGF 蛋白発現の経時的変化についての検討 (実験 3)

ステロイド投与家兎大腿骨近位部における VEGF mRNA、VEGF 蛋白の発現が経時的にどのように変化するかを知る目的で以下の実験を行った。

1. ラット VEGF cDNA と家兎 VEGF mRNA の交差性の確認

現在、家兎 VEGF cDNA の遺伝子配列は報告されていない。したがって、報告されているラット VEGF cDNA を用い、それが家兎 VEGF mRNA と交差反応するかどうかを検討した。

1) RNA の抽出

10 週齢で体重約 300g のウイスター系雄性ラット (日本チャールズリバー、横浜) 8 週齢で体重約 30g の Std:ddY マウス (日本 SLC、浜松) をそれぞれ 1 匹ずつ、および成熟日本白色家兎 1 羽をネンブタール (大日本製薬、大阪) の急速静注にて安楽死させ、それぞれから腎臓を摘出した。直ちに液体窒素により凍結し、RNA を抽出するまで -80℃ で保存した。凍結した組織サンプルから酸性グアニジン/フェノール/クロロフォルム法¹²⁾により総 RNA を抽出した。組織 100 mg に対して、2ml の RNAzol (Tel-Test, Friendswood, TX) を加えて、ホモジナイズし、4℃ で、5 分間、3000 回転で遠心して、上清を 1.5ml 遠心管に採取した。

採取した上清の10分の1量のクロロフォルムを加え、15秒間強く攪拌し、氷上に5分間静置した。4℃で、5分間、13000回転で遠心して、水層とフェノール層に分かれた層のうち、上層の水層を新しい1.5ml遠心管に採取した。採取した水層の2倍量のジエチルエーテルを加え、攪拌した後4℃で、5分間、13000回転で遠心して上層のジエチルエーテル層を除去して、水層に混入したフェノールを除去した。水層と等量のイソプロピルアルコールを加え、氷上に15分間静置した。4℃で、15分間、13000回転で遠心してRNAの沈殿を得た。75%エタノールで沈殿を洗浄後、4℃で、8分間、7500回転で遠心してエタノールを完全に除去した。RNA分解酵素を含まない水でRNAの沈殿を溶解した。

2) VEGF cDNA プローブの標識

ラット VEGF cDNA¹³⁾は、金沢大学大学院医学系研究科組織発達構築学分野・井関尚一教授より供与された。このcDNAを Megaprime DNA Labelling System (Roche, Mannheim, Germany) を用いて放射性標識した。1.5ml 遠心管に 25ng の VEGF cDNA を入れ、100℃、5分間熱処理して1本鎖DNAにした後、氷上に5分間静置した。その後、添付の10×緩衝液、primer (dN), dATP, dTTP, dGTP, [α -³²P]-dCTP ([α -³²P]-dCTP (3000Ci/mmol, Du Pont, Wilmington, USA) および、Klenow 酵素を加え、37℃で15分間保温した。反応をTE緩衝液で停止し、フェノール/クロロフォルム抽出をし、ジエチルエーテル処理により混入したフェノールを除去した。セファデックス G-50 カラム (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて、プローブ標識に利用されなかった [α -³²P]-dCTP を除去した。その後 RI カウンターを用いて、プローブが $2 \sim 3 \times 10^8$ dpm/ μ g の特異的放射活性をもつことを確認した。

3) ノーザンブロット法

それぞれ 20 μ g の総 RNA は、Thomas の方法¹⁴⁾に従ってグリオキサールにより変性し、100ng/ml の濃度の臭化エチジウムを含んだ 1% アガロースゲルにより電気泳動を行った。RNA マーカーとして、RNA ラダー (BRL, Gaithersburg, USA) を用いた。電気泳動後、UV イルミネータにより各サンプルの rRNA の位置を確認した。引き続き RNA をアガロースゲルからナイロンメンブレン (Pall BioSupport, Port Washington, USA) に一晩転写し、転写後 UV ストラタリンカー 1800 (Stratagene, La Jolla, USA) を用いて 120 ミリジュールの波長 254nm の紫外線を照射してメンブレンに固着させた。このメンブレンについて、1M 塩化ナトリウム、50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5)、10×デンハルト溶液 (1×デンハルト溶液は、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% ファイコール、0.02% ウシ血清アルブミン)、0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、10mM EDTA、250ng/ml 熱変性サケ精子 DNA からなる プレハイブリダイゼーション溶液を用いて、65℃で2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。続いて、プレハイブリダイゼーション溶液に熱変性した 32P 標識 VEGF プローブを加え、65℃で16～24時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを 2×SSC (1×SSC は 0.15M 塩化ナトリウム、0.015M クエン酸ナトリウム) により 65℃で10分間2回洗浄し、ついで 0.1% SDS を含む 2×SSC により 65℃で15分間2回洗浄した。洗浄後、X線フィルム BIOMAX MS (Kodak, Rochester, USA) を用いて -80℃で48時間の感光を行った。

2. ステロイド投与家兎の大腿骨近位部における VEGF-mRNA

発現の経時的变化

実験1と同様に、ステロイド群 (6群) と対照群のあわせて7群間で検討した。

各群 (3羽) の家兎の大腿骨を採取し、組織切断機 (Exakt, Hamburg, Germany) を用いて大腿骨近位部を切断、骨髓を摘出し、総 RNA を抽出してノーザンブロット法を行った。得られたバンドの RI 活性の検出には、金沢大学アイソトープ総合センターのバイオイメージングアナライザー BAS-2000 (富士フィルム, 東京) を用い、データの解析を画像解析ソフト Image Gauge version 3.41 (富士フィルム) で行った。

得られた値は $\bar{x} \pm SD$ で表し、これらの群間の比較には一元配置分散分析法を用い、有意差があった場合の群間の比較は Scheffe の F 検定を用いた。危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありとした。

3. ステロイド投与家兎の大腿骨近位部における VEGF 蛋白発現の経時的变化

ステロイド群の3日群、5日群、1週群の3群と対照群のあわせて4群間で検討した。

各群の家兎の大腿骨の骨髓を採取し、直ちに液体窒素により凍結し、蛋白を抽出するまで -80℃で保存した。摘出した骨髓 400mg に対して、2ml の lysis buffer, RIPA を加えホモジナイズし、BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA) を用いて蛋白を定量した。

1) ウェスタンブロット法

電気泳動は Laemmli ら¹⁵⁾の SDS-PAGE 法により行った。アクリルアミドゲルの濃度は、濃縮用ゲルは 5% とし、分離用ゲルは 12% とし、各試料は 15 μ l (蛋白濃度は 3 μ g/ μ l) ずつ泳動した。電気泳動終了後、ゲル上の蛋白をポリビニリデンジフルオリド膜 (polyvinylidene difluoride membrane) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) に転写させた。0.05% ツイーン 20 加 PBS (PBS with 0.05% Tween20, PBS-T) に 5% スキムミルク (雪印, 東京) を加えた溶液でブロッキングを行った後、抗 VEGF マウスモノクローナル抗体 (×200, NEOMARKERS, California, USA) を用いて 4℃で一晩反応させた。抗原の検出には、エンハンスドケモルミネセンス (enhanced chemoluminescence, ECL) ウェスタンブロット検出システム (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を使用した。

成 績

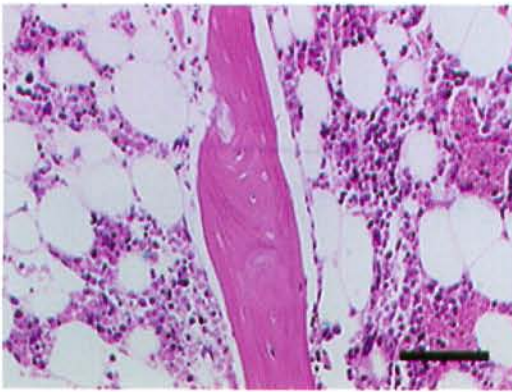
I. ステロイド投与家兎における骨壊死部の病理組織学的変化と骨壊死発生率、および発生部位についての検討 (実験1)

1. 病理組織学的変化

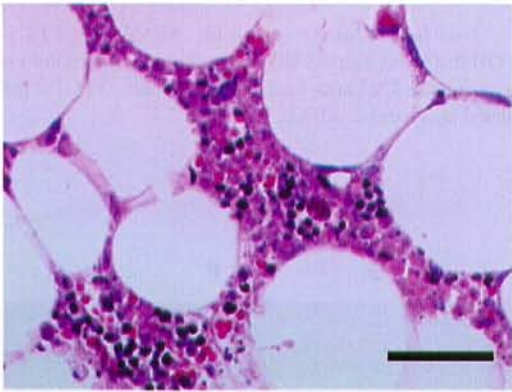
対照群、1日群、3日群には特に著変は認められなかった。

5日群、1週群においては、骨壊死部の好酸性が上昇し、周囲の正常骨髓組織との境界は明瞭であった。骨梁の骨細胞は、壊死して核が不染性化しているか、あるいは空虚骨小窩 (empty lacunae) を示していた。その周囲の骨髓造血細胞は壊死に陥った細胞と変性した細胞とが混在した状態であった。脂肪細胞は壊死に陥っているもののその細胞構築は比較的保たれていた。壊死部周囲にはしばしば出血がみられ、正常骨髓との境界には軽度の浮腫が見られた (図 1A, B)。

2週群では、5日群、1週群に比べ骨壊死部の好酸性は増強し、壊死骨梁周囲の骨髓造血細胞はほぼ完全に壊死に陥っていた。



A



B

Fig. 1. Histopathologic findings of osteonecrosis in 5-day group. (A) and (B), Empty lacunae were found in bone trabeculae, and the surrounding bone marrow tissue also necrotic changes (hematopoietic cell necrosis and fat cell necrosis). These were observed in the area between the metaphysis and diaphysis of the proximal femur. Although the fat cells showed degenerative or necrotic change, their architectures did not collapse. HE staining. Original magnification, (A) $\times 200$, (B) $\times 400$. Scale bars, (A) $20 \mu\text{m}$, (B) $10 \mu\text{m}$.

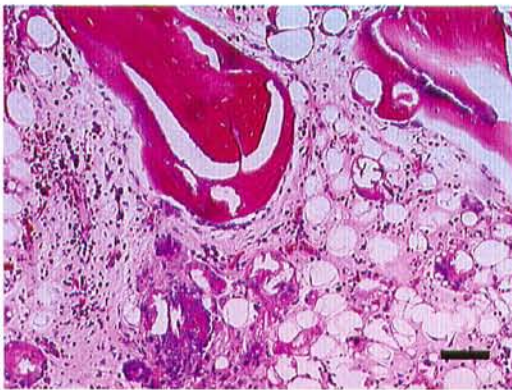
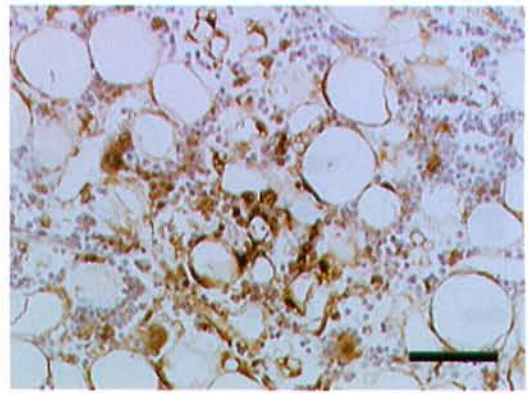
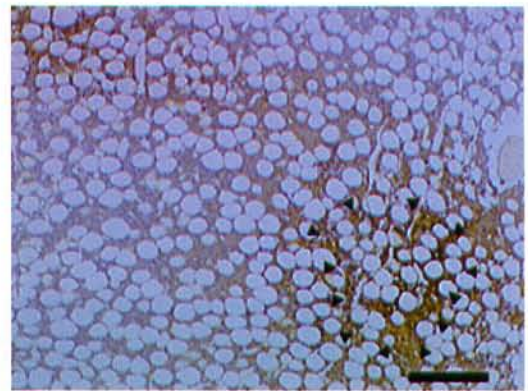


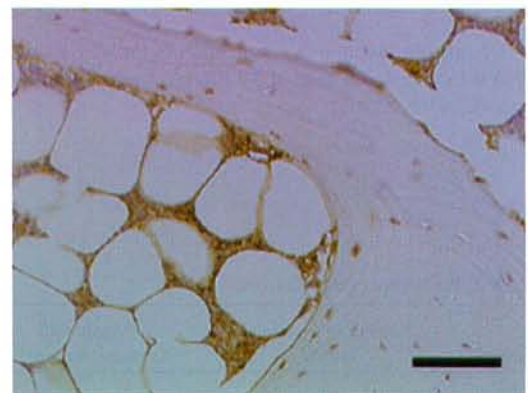
Fig. 2. Histopathologic findings of osteonecrosis in 4-week group. Necrotic bone trabeculae showing empty lacunae were surrounded by appositional bone formation that was associated with granulation tissue in the area surrounding necrotic bone marrow tissue. HE staining. Original magnification, $\times 100$. Scale bars, $20 \mu\text{m}$.



A



B



C

Fig. 3. Immunohistochemical findings of VEGF in 3-day group. (A) The VEGF-expressing cells were aggregated and among the bone marrow cells, e.g., interstitial and myeloid cells. (B) The larger aggregation of the VEGF-expressing cells (arrow heads). (C) The VEGF-expressing osteocytes were found in bone trabeculae surrounding the VEGF-expressing bone marrow cells. VEGF staining. Original magnification, (A) $\times 200$, (B) $\times 20$, (C) $\times 200$. Scale bars, (A) $20 \mu\text{m}$, (B) $200 \mu\text{m}$, (C) $20 \mu\text{m}$.

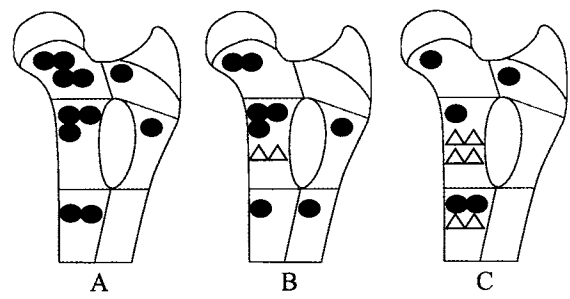


Fig. 4. Schematic drawing of the location of the VEGF positive cells and the osteonecrotic areas in the proximal femur. ●, VEGF positive cells. △, necrotic focus. (A) 3-day group, (B) 5-day group, (C) 1-week group

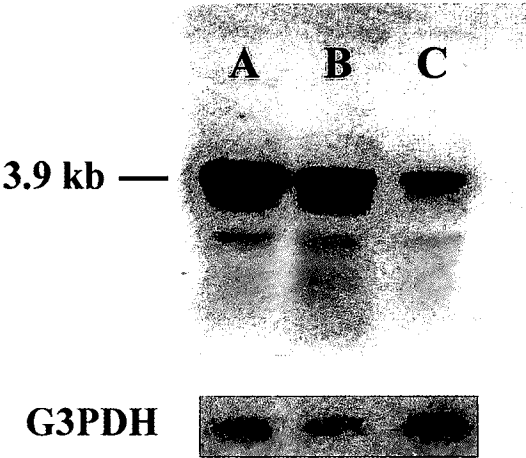


Fig. 5. Northern blot detection of mRNAs for VEGF and G3PDH in (A) rat kidney, (B) mouse kidney, (C) rabbit kidney. 20 μg of total RNA was loaded in each line. VEGF mRNA is localized as a band at 3.9 Kb.

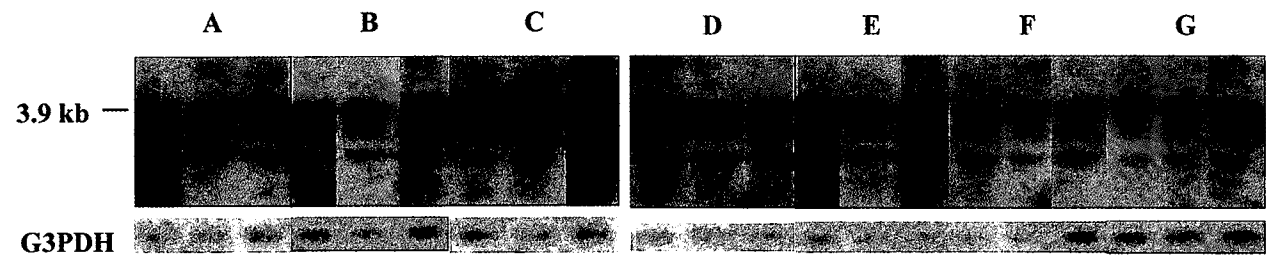


Fig. 6. Northern blot detection of mRNAs for VEGF and G3PDH in rabbit femur. 20 μg of total RNA was loaded in each line. VEGF mRNA is localized as a band at 3.9 Kb. (A) control group, (B) 1-day group, (C) 3-day group, (D) 5-day group, (E) 1-week group, (F) 2-week group, (G) 4-week group

Table 1. Prevalence of osteonecrosis

Group	Number of examined rabbits	Number of osteonecrosis
Control	10	0
1-day	10	0
3-day	10	0
5-day	10	2
1-week	10	5
2-week	10	6
4-week	10	6

* statistically significant with Fisher's exact test (P<0.05).
** not significant among each other using χ^2 test.

Table 2. Prevalence of VEGF expression

Group	Number of examined rabbits	Number of VEGF positive rabbits
Control	10	1
1-day	10	2
3-day	10	5
5-day	10	6
1-week	10	5
2-week	10	2
4-week	10	2

* not statistically significant with χ^2 test.

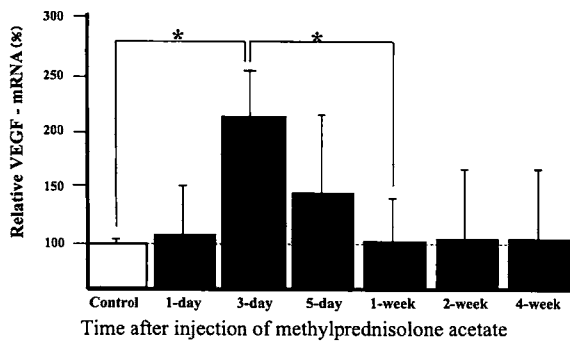


Fig. 7. Relative VEGF-mRNA in rabbit femur. Increased expression of a band was shown in semiquantitative fashion by densitometric scanning of a representative gel. The experiment was repeated three times with similar results. * $P < 0.05$ by Scheffe F test. Values are expressed as \bar{x} SD.

また壊死した脂肪細胞は構築を失い虚脱していた。

4週群では、壊死した骨髄の周囲に著明なマクロファージや異物巨細胞の集簇が認められ、周囲から修復が進んでいた。壊死骨梁周囲には旺盛な添加骨形成が認められた(図2)。これらの組織像は各群で特徴的であり、4週群の標本に5日群や1週群などの早期骨壊死の組織像が認められることはなかった。

2. 骨壊死発生率

骨壊死は対照群、1日群、3日群には認められなかったが、5日群で10羽中2羽(20%)、1週群で10羽中5羽(50%)、2週群で10羽中6羽(60%)、4週群で10羽中6羽(60%)に認めた。対照群、1日群、3日群に比べ1週群、2週群、4週群はその骨壊死発生頻度において高く、また5日群、1週群、2週群、4週群の4群間では有意差はなかった(表1)。

3. 骨壊死発生部位

ほとんどの骨壊死は骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に集中しており、その分布状態も骨壊死が認められた5日群以降の各群間で変化はなかった。

II. ステロイド投与家兎大腿骨の骨病変部における VEGF の発現についての検討(実験2)

1. VEGF 発現細胞の観察

VEGF 発現細胞は、対照群、1日群においては散在性に認められものの、明らかな集簇としては認められなかった。3日群、5日群、1週群においては、脂肪細胞、マクロファージ、血管内皮細胞の陽性像を伴った VEGF 発現細胞の集簇を認めた(図3A)。また3日群においては、広範囲におよぶ発現細胞の集簇を認めた(図3B)。骨細胞はほとんどが陰性であったが、VEGF を発現している骨髄細胞に隣接した骨細胞の陽性像が、3日群の一部においてのみ観察された(図3C)。VEGF は細胞種によらず、比較的多種の細胞に発現していた。

また、明らかな骨壊死または骨髄壊死が存在する部位には全例 VEGF 発現細胞を認めなかった。一方、1週群、2週群、4週群の骨壊死または骨髄壊死の周囲においては、VEGF 発現細胞は散在性に認められものの、明らかな集簇としては認められなかった。

2. VEGF 陽性率

免疫組織化学的に VEGF 陽性率は、コントロール群が10羽中1羽(10%)、1日群が10羽中2羽(20%)、3日群が10羽中5羽

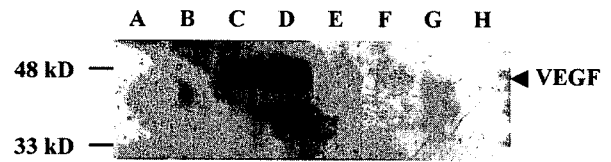


Fig. 8. Western blot detection of VEGF protein in rabbit femur. VEGF is detected in protein by incubating protein lysates with heparin-agarose beads, eluting with sample buffer, followed by electrophoresis through a 12% polyacrylamide gel. VEGF is localized as a band at ~46 KD. (A) and (B) control group, (C) and (D) 3-day group, (E) and (F) 5-day group, (G) and (H) 1-week group

(50%)、5日群が10羽中6羽(60%)、1週群が10羽中5羽(50%)、2週群が10羽中2羽(20%)、4週群が10羽中2羽(20%)であった。コントロール群、1日群、2週群、4週群の10~20%に比較して、3日群、5日群、1週群が、50~60%とやや高い結果となった(表2)。

3. VEGF の陽性部位

II-2の結果で VEGF 陽性率の少なかったコントロール群、1日群、2週群、4週群においては明らかな傾向は認めなかったが、VEGF 陽性率が50~60%と高かった3日群、5日群、1週群においては、骨壊死の好発部位である骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に多い傾向を認めた(図4)。

III. VEGF-mRNA、VEGF 蛋白発現の経時的変化についての検討(実験3)

1. ラット VEGF cDNA と家兎 VEGF mRNA の交差性の確認

ラット、マウス、家兎のいずれの腎臓からも、mRNA の発現を示すバンドを認め、その分子量は3.9kbであった(図5)。その発現量は、多いものからラット、マウス、家兎の順であった。ラットの VEGF-mRNA は3.9kbであることが知られており^{13) 16)}、これらのバンドはいずれも VEGF-mRNA と考えられた。

2. ステロイド投与家兎の大腿骨近位部における VEGF-mRNA 発現の経時的変化

上記の実験により、ラットの VEGF-cDNA をプローブとして用いて、家兎の大腿骨骨髄における VEGF-mRNA の発現を検討した。その結果、実験3の1と同様に、すべての群で3.9kbの VEGF-mRNA を示すバンドを認めた(図6)。RNA は各群はほぼ同等量を用いており、その発現量はバンドの濃度に比例することから、control 群の平均を100%とした比で表すと control 群に比べステロイド投与群では経過とともに上昇しており、3日群でピークを認めた。その発現量はおよそ2.1倍であり、有意に高い結果であった($P < 0.05$)。その後は減少し、1週群から4週群まではプラトーで、その発現量は control 群とほぼ同等量であった(図7)。

3. ステロイド投与家兎の大腿骨近位部における VEGF 蛋白発現の経時的変化

3日群において VEGF の発現と考えられるバンドを認めた。またその分子量は46kDであった(図8)。その他の群においては、発現を示すバンドは明らかでなかった。

考 察

ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生機序については、外傷性股関節脱臼などにおける、栄養血管の損傷後に発生する外傷性大腿骨頭壊死と病理組織学的に類似することから¹⁷⁾、最終的に骨内の虚血によって発生するという点では意見の一致をみている¹⁸⁾。しかしながら、虚血の発生した時期や虚血に至る詳細な機序などは未だ解明されていない。これまでにステロイド性大腿骨頭壊死症の病因として、骨頭栄養血管の粥状動脈硬化や血栓¹⁹⁾、脂肪血栓²⁰⁾、脂肪細胞の増殖や肥大²¹⁾、骨髓内圧の上昇²²⁾、静脈系還流障害²²⁾など、他にも様々なもの^{18) 24)}が報告されてきたが、これらはいずれも骨壊死が完成された後の事象をもとに推測されたものであった。一般に臨床例では、骨壊死が発生した直後の早期の病理組織像を得ることが困難である。そのため、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生機序や病態解明には、有効な動物モデルの作成が重要であると考えられてきた。

これまでに、様々な動物モデルを用いて、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症を再現しようという試みがなされてきたが、有効な動物モデルは存在しなかった^{21) 25)}。しかし近年、Yamamotoら⁶⁾はメチルプレドニゾロンを家兎に大量に投与することで、骨幹端から骨幹部にかけて病理組織学的にヒトの骨壊死と類似した骨壊死が生じることを最初に報告した。また加畑⁵⁾は、体重1kgあたり4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを週1回、4週間投与した家兎モデルを作成し、15羽中11羽(73%)に骨壊死が発生したと報告している⁵⁾。しかしながら、Yamamotoら⁶⁾のモデルでは、ステロイドの投与量が多すぎて死亡例がしばしば見られること、加畑らの方法では、ステロイドを毎週投与するために、虚血発作の発生時期を見るには不向きであることなどから、ステロイドの投与量と投与方法を再考する必要がある。そこで今回は、4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを1回のみ投与した家兎を用いて検討を行った。その結果、骨壊死は対照群、1日群、3日群には認められなかったが、5日群で10羽中2羽(20%)、1週群で10羽中5羽(50%)、2週群で10羽中6羽(60%)、4週群で10羽中6羽(60%)に認めていた。また1週群から4週群までの3群間で骨壊死発生頻度に統計学的な有意差はなく、発生頻度はステロイド投与後5日群で増加し、その後はプラトーになる傾向がみられた。以上より4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを1回のみ投与した家兎を用いても、再現性の良いステロイド性骨壊死像が得られており、ステロイド性骨壊死動物モデルとして有用であることが確認された。

一方、組織に虚血・低酸素状態が発生すると、その周囲組織は防御反応を示す。そのひとつとしてVEGFを発現することが知られている^{26)~28)}。またVEGFを誘導する因子の中では、低酸素がもっとも強力であり^{29) 30)}、したがって、ある組織中のVEGFの検出は、逆にその周囲組織の虚血状態を反映すると考えられる。動物モデルにおいては、低酸素状態で飼育したラットの心臓、肝臓、腎臓、脳、筋の組織中にVEGFの発現の亢進を認めた報告⁹⁾や、脳虚血ラットやマウスにおいて、脳組織中のVEGFの発現の亢進を認めた報告^{7) 10) 11)}、家兎の一過性脊髄虚血モデルにおいて、脊髄組織中にVEGFの発現の亢進を認めた報告⁸⁾など、数多くのものがある^{28) 31)}。VEGFに関する上記のような特徴を踏まえるとステロイド投与家兎において、

VEGFの発現を検討することはステロイド性骨壊死と虚血との関連をより明らかにし、ステロイド投与後に誘発される虚血発作の発生した時期を特定することができる。これにより、骨壊死発生のメカニズムをさらに解明でき、血管新生療法を応用すれば骨壊死の予防法を確立することにもつながると考えられる。これまでに本動物モデルを含め、ステロイド性骨壊死の他の動物モデル^{25) 32)}において、骨壊死を引き起こす虚血発作の存在を直接証明した報告はない。そこで本研究では、ステロイド投与家兎の大腿骨におけるVEGFの発現に着目し、ステロイド性骨壊死と虚血の関連性について検討した。本モデルにおける免疫組織化学的なVEGFの発現について、その特徴は、実験2では、1) VEGF発現細胞は局所に集簇してみられることが多いこと、2) 間質系細胞のみならず、骨髓血球系の細胞を含めた多種の細胞に発現していること、3) 1週群、2週群、4週群の骨壊死部とその周囲組織には認めないこと、4) VEGF陽性率が、3日群、5日群、1週群で高く、この3群においてはVEGF陽性部位が骨壊死好発部位である骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に多いというものであった。上記の3) 4)の病理組織学的特徴から、VEGFは骨壊死発生前のごく限られた期間に発現し、骨壊死発生後は発現しなかった、と考えることができる。またさらに1) 2)の特徴を踏まえると、本モデルの大腿骨においては、ステロイド投与後に局所の虚血、低酸素状態が発生し、それに反応して組織が一過性にVEGFを発現したのではないかと推察した。

本研究では、ラットのVEGF-cDNAをプローブとして用い、家兎のVEGF-mRNAの検出を行った。過去にラットVEGF-cDNAを用いて家兎のVEGF-mRNAの検出を行った報告はなく、またラットのVEGF-mRNAの塩基配列については解明されつつあるが、家兎のVEGF-mRNAの塩基配列や動物間の差についてもいまだ明らかにはされていない³³⁾。今回の実験3の結果では、ラット、マウス、家兎のVEGF-mRNAにある程度の相同性を認めることができた。一方、家兎のVEGF-mRNAの分子量について、Fanら¹³⁾、Xuら¹⁶⁾は、いずれも3.9kbであると報告し、Dasら³¹⁾も4.2kbと3.7kbにバンドの存在を報告している。本研究でもこれらと同様の結果が得られた。したがって、家兎のVEGF-mRNAの検出にラットのVEGF-cDNAをプローブとして用いる方法は有用なものであると考えられた。

虚血とVEGF-mRNAやVEGF蛋白の発現に関して、Plateら⁷⁾はラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、病理組織学的にVEGF-mRNAの発現を検討している。その結果、VEGF-mRNAの発現は閉塞後3時間から見られ、24時間後にピークとなり、1週間後まで持続していた。同様にJinら¹⁰⁾もラットの一過性全脳虚血モデルにおいて、VEGF-mRNAの発現が虚血後8時間から見られ、24時間後にピークとなることに加えて、VEGF蛋白も24時間後にピークを認めたと報告している。またHayashiら⁸⁾は、家兎の脊髄虚血後再灌流モデルにおいて、再灌流後8時間でVEGF蛋白のピークを認めたと報告している。ウェスタンブロット法における家兎のVEGF蛋白の分子量については、Hayashiら⁸⁾が38kDと45kDにCherwekら²⁶⁾、Annexら²⁷⁾はともに46kDであったと報告している。本モデルにおいては、実験3、4から、VEGF-mRNAの発現がステロイド投与後3日目にピークを認め、それと同時にVEGF蛋白も3日目に発現し、その分子量は46kDであった。今回の結果と過去の報告をふまえると、本モデルにおいては、ステロイド投与後早いものでは2

日目に、遅くとも3日前後には虚血発作が発生したのではないかと考えられる。近年、MRIの普及とともに臨床的に骨壊死の早期発見が可能となっており、その発生時期について考察したいいくつかの報告がある。Kuboら³⁴⁾は、腎移植後に伴う大腿骨頭壊死について、Shimizuら³⁵⁾、Sakamotoら³⁶⁾はステロイド投与後の大腿骨頭壊死発生に関する前向き研究を行っている。それらによると、ステロイド大量投与後6～10週で骨頭壊死の存在を示すバンド像が見られている。一方、このMRIのバンド像は、壊死部に対する修復像を捉えたものであることが、すでに明らかになっている³⁷⁾。またSuganoら³⁸⁾の大腿骨頭部骨折の報告やNakamuraら³⁹⁾の外傷性股関節脱臼の動物実験からは、骨頭の虚血が生じてから、MRIでバンド像として確認できるまでには約4週を要することも明らかにされている。これらを考慮した場合、ヒトのステロイド誘発性大腿骨頭壊死の発生時期は、バンド像が確認される時点より少なくとも4週間はさかのぼった時期であり、ステロイド大量投与後2～6週であると考えられる。さらにステロイドの壊死組織に対する修復抑制作用を考慮するとさらに早い時期である可能性も述べている。したがって、本研究の結果から、ヒトと家兎のステロイドに対する反応の差を考慮してもステロイド投与後1週以内というきわめて早期に骨頭壊死が発生している可能性が考えられる。

ステロイド性骨壊死の再発について、かつては、Inoueら⁴⁰⁾やSaitoら⁴¹⁾が報告したように、大腿骨頭壊死を引き起こす虚血発作が骨頭内で断続的に生じることで、最終的に骨頭壊死が完成すると考えられていた。しかし、Yamamotoら⁴²⁾は606例の特発性大腿骨頭壊死症の摘出標本を病理組織学的に検討した結果、壊死の再発を認めた例は2例(0.3%)のみであったとの報告をしている。またMRIによる前向き研究でも、生じた壊死範囲は縮小することはあっても拡大したものはなく、さらに壊死の再発が認められた症例はなかったと報告されている^{35) 36)}。さらにこれらの報告では、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死があたかも心筋梗塞や脳梗塞のごとく、きわめて急性に生じる疾患であると解釈されており、その虚血発作はステロイドの継続投与の有無にかかわらず1回のみであることを示唆していると述べている。加畑⁵⁾はステロイド性骨壊死の発生時期や骨壊死の再発に関して、家兎にステロイドを投与し、1週、2週、4週後に屠殺した場合の骨壊死発生率がそれぞれ47%、60%、73%とほぼプラトーで有意差を認めず、病理組織学的にも新たな骨壊死が発生した形跡や骨壊死範囲が拡大した形跡も認めなかったことから、本モデルにおける骨壊死は、ステロイド投与後1～2週というきわめて早期に生じ、かつ骨頭壊死を引き起こす虚血発作は、初回ステロイド投与後1週前後に1回のみ発生する、繰り返されることのない非再発性のものであると推察している。今回、VEGF-mRNAの経時的発現量を検討したが、その発現量が投与後3日目をピークとした一峰性であったという結果は、ステロイド投与後に発生する虚血発作はやはり1回のみであったと考えられる。これは、骨壊死を5日群より認め、ステロイド投与1週以降はほぼその発生率に変化がなかった実験Ⅰの結果やVEGFの陽性率が3日群、5日群、1週群に高く、それ以降は低下するという実験Ⅱの結果を支持するものであり、さらに前述した特発性大腿骨頭壊死症の摘出標本の病理組織学的検討やMRIによる前向き研究の結果をも裏付けるものと考えられる。

以上から、ステロイド性骨壊死はステロイド投与後3日前後

に虚血発作が発生し、かつ繰り返されることのない非再発性のものである。この特徴は、骨壊死発生の予防、あるいは治療ということを考える上で重要である。すなわち、他の急性虚血性疾患では虚血発作の発生時に一致させた何らかの治療法が試みられているが、ステロイド性骨壊死においても、ステロイド投与開始と同時にしくは開始以前から、なんらかの予防策を講じる必要があると考える。最近VEGFを用いた血管新生療法が注目を集めている。イヌの冠動脈閉塞モデルにウイルスベクターを用いたVEGFの局所投与や⁴³⁾家兎の慢性下肢動脈閉塞モデルへVEGFを投与することで^{44) 45)}、側副血行を発達させ、虚血の改善を試みる基礎的研究や、最近ではヒトへの臨床治験も行われており^{46) 49)}、近い将来には有効な治療法のひとつになることが期待されている。本研究の結果から、こうした血管新生療法が骨壊死発生後の組織の早期修復、壊死範囲の縮小化や壊死発生そのものの予防という点から、他の急性虚血性疾患と同様にステロイド誘発性大腿骨頭壊死症にも応用できる可能性があると考えられる。

結 論

ステロイド投与家兎骨壊死モデルを用いて、ステロイド投与後の骨内VEGFの発現を調べ、ステロイド性骨壊死発生との関連およびその虚血発作の発現時期について検討し、以下の結論を得た。

1. 病理組織学的に骨壊死は対照群、1日群、3日群には認められなかったが、5日群で10羽中2羽(20%)、1週群で10羽中5羽(50%)、2週群で10羽中6羽(60%)、4週群で10羽中6羽(60%)に認めた。また、ほとんどの骨壊死は骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に集中しており、その分布状態も骨壊死が認められた5日群以降の各群間で変化はなかった。
2. 4mgの酢酸メチルプレドニゾロンを1回のみ投与した家兎においては、再現性よくステロイド性骨壊死像が得られており、ステロイド性骨壊死動物モデルとして有用であることが確認された。
3. 免疫組織化学的に3日群、5日群、1週群において、VEGF発現細胞は局所に集簇してみられる場合が多く、間質系細胞のみならず骨髄血球系の細胞を含めた多種の細胞に発現していた。また1週群、2週群、4週群の骨壊死、骨髄壊死部とその周囲組織には認めなかった。VEGF陽性率は3日群、5日群、1週群でやや高く、VEGF陽性部位は骨壊死の好発部位である骨幹端部、転子下部、骨幹部の内側に多かった。
4. 本モデルの大腿骨においては、ステロイド投与後に局所の虚血、低酸素状態が発生し、それに対して組織がVEGFを発現したと考えた。
5. VEGF-mRNAの発現は、ステロイド投与後3日目にピークを認め、それと同時にVEGF蛋白も3日目に発現した。またVEGF-mRNA発現のピークはある特定の一時期だけであった。
6. 本モデルにおいては、ステロイド投与後早いものでは2日目に、遅くとも3日前後には虚血発作が発生し、その虚血発作は繰り返すことのないものであると考えた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚の謝意を捧げるとともに、直接の御助言と多大なる御指導をいただきました金沢医科大学整形外科科本忠美教授に深謝いたします。また研

究の遂行にあたり、貴重な御助言を賜りました金沢大学大学院医学系研究科組織発達構築学分野（旧解剖学第一講座）井関尚一教授、同講座若山友彦助教授、明海大学歯学部口腔解剖学第2講座天野修教授、金沢大学整形外科加畑多文助手、に感謝いたします。最後に、本研究の遂行に御協力いただきました金沢大学整形外科第二研究室の先生方、病理標本作製に御協力を惜しまれなかった笠井洋子氏、金沢大学大学院医学系研究科組織発達構築学分野の方々に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 竹下節子, 田中隆, 近藤亨子, 廣田良夫. 臨床調査個人票を用いた特発性大腿骨頭壊死症の疫学像の検討. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成13年度研究報告書:4-8, 2002
- 2) Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* 77:459-474, 1995
- 3) Chang CC, Greenspan A, Gershwin ME. Osteonecrosis: current perspectives on pathogenesis and treatment. *Semin Arthritis Rheum* 23:47-69, 1993
- 4) Lee CK, Hansen HT, Weiss AB. The "silent hip" of idiopathic ischemic necrosis of the femoral head in adults. *J Bone Joint Surg Am* 62:795-800, 1980
- 5) 加畑多文. ステロイド性骨壊死モデルの作成とその病理組織学的検討—ステロイド性骨壊死の発生機序およびアポトーシスとの関連について—. 金沢大学十全医学会雑誌 109:262-278, 2000
- 6) Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 40:2055-2064, 1997
- 7) Plate KH, Beck H, Danner S, Allegrini PR, Wiessner C. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:654-666, 1999
- 8) Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y. Expression of angiogenic factors in rabbit spinal cord after transient ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:63-71, 1999
- 9) Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71:374-379, 1994
- 10) Jin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 99:577-585, 2000
- 11) Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156:965-976, 2000
- 12) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
- 13) Fan L, Wakayama T, Yokoyama S, Amano O, Iseki S. Downregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in the kidney in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron* 90:95-102, 2002
- 14) Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5201-5205, 1980
- 15) Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
- 16) Xu F, Severinghaus JW. Expression and response to hypoxia of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat and rabbit tissues. *Adv Exp Med Biol* 454:311-317, 1998
- 17) Milgram JW. Radiologic and histologic pathology of nontumorous disease of bone and joints, 1st ed, p1027-1044, Lea & Febiger, Philadelphia, London 1990
- 18) Zalavras C, Dailiana Z, Elisaf M, Bairaktari E, Vlachogiannopoulos P, Katsaraki A, Malizos KN. Potential aetiological factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head. *Eur J Clin Invest* 30:215-221, 2000
- 19) Atsumi T, Kuroki Y. Role of impairment of blood supply of the femoral head in the pathogenesis of idiopathic osteonecrosis. *Clin Orthop* 277:22-30, 1992
- 20) Jones JP. Fat embolism and osteonecrosis. *Orthop Clin North Am* 16:595-633, 1985
- 21) Arlet J, Ficat P. Anatomico-clinical (radiological and etiological) forms of so-called primary chronic ischemia and osteonecrosis of the upper femoral epiphysis *Rev Rhum Mal Osteoartic* 38:41-49, 1971
- 22) Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 59:729-735, 1977
- 23) 松本忠美, 勝木保夫, 西野 暢, 中村琢哉, 柳瀬茂樹, 武田秀之. ステロイド投与下における大腿骨頭内圧. 厚生省特定疾患特発性大腿骨頭壊死調査研究班 平成3年度研究報告書:87-89, 1992
- 24) Glueck CJ, Freiberg R, Tracy T, Stroop D, Wang P. Thrombophilia and hypofibrinolysis: pathophysiologies of osteonecrosis. *Clin Orthop* 334:43-56, 1997
- 25) Gold EW, Fox OD, Weissfeld S, Curtiss PH. Corticosteroid-induced avascular necrosis: an experimental study in rabbits. *Clin Orthop* 135:272-280, 1978
- 26) Cherwek DH, Hopkins MB, Thompson MJ, Annex BH, Taylor DA. Fiber type-specific differential expression of angiogenic factors in response to chronic hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H932-938, 2000
- 27) Annex BH, Torgan CE, Lin P, Taylor DA, Thompson MA, Peters KG, Kraus WE. Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 274:H860-867, 1998
- 28) Yew DT, Yi X, Chan WY, Lam WK. A rabbit model of proliferative vitreoretinopathy induced by injection of astrocytic cultures. *Cell Mol Neurobiol* 19:759-773, 1999
- 29) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845, 1992

- 30) 田中 亨, 倉林正彦. 低酸素における遺伝子発現調節—虚血を解除する仕組み. 細胞工学 19:1154-1159, 2000
- 31) Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 56:1390-1399, 1997
- 32) Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop* 316:235-243, 1995
- 33) Skorjanc D, Jaschinski F, Heine G, Pette D. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Am J Physiol* 274:C810-818, 1998
- 34) Kubo T, Yamazoe S, Sugano N, Fujioka M, Naruse S, Yoshimura N, Oka T, Hirasawa Y. Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. *Magn Reson Imaging* 15:1017-1023, 1997
- 35) Shimizu K, Moriya H, Akita T, Sakamoto M, Suguro T. Prediction of collapse with magnetic resonance imaging of avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* 76:215-223, 1994
- 36) Sakamoto M, Shimizu K, Iida S, Akita T, Moriya H, Nawata Y. Osteonecrosis of the femoral head: a prospective study with MRI. *J Bone Joint Surg Br* 79:213-219, 1997
- 37) 久保俊一, 山本卓明, 居石克夫. 特発性大腿骨頭壊死症のMR画像と組織像. 整形外科 48:761-768, 1997
- 38) Sugano N, Masuhara K, Nakamura N, Ochi T, Hirooka A, Hayami Y. MRI of early osteonecrosis of the femoral head after transcervical fracture. *J Bone Joint Surg Br* 78:253-257, 1996
- 39) Nakamura T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Kadoya M. Early magnetic resonance imaging and histologic findings in a model of femoral head necrosis. *Clin Orthop* 334:68-72, 1997
- 40) Inoue A, Ono K. A histological study of idiopathic avascular necrosis of the head of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 61:138-143, 1979
- 41) Saito S, Ohzono K, Ono K. Early arteriopathy and postulated pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head. The intracapsular arterioles. *Clin Orthop* 277:98-110, 1992
- 42) Yamamoto T, DiCarlo EF, Bullough PG. The prevalence and clinicopathological appearance of extension of osteonecrosis in the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 81:328-332, 1999
- 43) Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:887-895, 1998
- 44) Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 94:3281-3290, 1996
- 45) Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Hodge E, Thirumurti V, Goncalves L, Unger EF. Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc Res* 44:294-302, 1999
- 46) Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 100:468-474, 1999
- 47) Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J* 138:S132-141, 1999
- 48) Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL, Gold JP, Simons M. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 100:1865-1871, 1999
- 49) Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Losordo DW, Hendel RC, Bonow RO, Eppler SM, Zioncheck TF, Holmgren EB, McCluskey ER. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 142:872-880, 2001

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor during Development of Steroid-induced Osteonecrosis: An Experimental Study in Rabbits Sinichi Yagishita, Department of Restorative Medicine of the Neuro-musculoskeletal System, Division of Cancer Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med. Soc., **115**, 10 – 20 (2006)

Key words osteonecrosis, rabbit, steroid, vascular endothelial growth factor

Abstract

The association between steroid use and the development of osteonecrosis (ON) has been well established. Increased use of steroids for immunosuppression in patients with organ transplants and for conditions such as systemic lupus erythematosus has resulted in an increased incidence of steroid-induced ON. However, the precise pathogenesis of steroid-induced ON remains unknown. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic promotor that is rapidly induced as a response to local hypoxia. The up-regulation of VEGF has been validated in several animal models. The present study in a rabbit model of ON was performed to investigate the relationship between the expression of VEGF and the development of steroid-induced ON, and to clarify the role of ischemia in the development of ON. Mature Japanese white rabbits were divided into 6 treatment groups and an untreated control group. The treatment groups received a single intramuscular injection of methylprednisolone acetate (4 mg/kg). The animals in the treatment groups were sacrificed at different time points (1 day, 3 days, 5 days, 7 days, 14 days, and 28 days) after the steroid treatment. On histopathological examination, the earliest indication of ON (dead bone marrow cells and osteocytes) was five days after the steroid treatment. ON was observed in the area between the metaphysis and diaphysis of the proximal femur. On immunohistochemical examination, upregulated VEGF expression could be found up to one week after the steroid treatment. The VEGF-expressing cells were aggregated and among the bone marrow cells, e.g., interstitial and myeloid cells. The VEGF positive cells tended to be located in the medial proximal part of the femur between metaphysis and diaphysis, where osteonecrosis was frequently observed. The peaks of VEGF- mRNA expression (2.1-fold greater than that of the untreated control rabbits) and VEGF protein production occurred 3 days after the steroid treatments. VEGF- mRNA expression decreased gradually after that peak and became almost equal to that of untreated control at 7 days after steroid treatments. These results suggest that the ischemic event that causes ON also switched on VEGF production and that the onset of ischemic ON occurs soon (approximately 3 days) after the initial steroid treatment. These findings support the hypothesis that steroid-induced ON is caused by an acute single ischemic event after initial steroid treatment.